

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1970

N° 354

THESE

Pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

MICHEL COHEN SOLAL

Né le 4 décembre 1943 à Alger (Algérie)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

1970

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA
PATHOLOGIE MOLÉCULAIRE DE L'HÉMOGLOBINE.
A PROPOS D'UNE HÉMOGLOBINE INSTABLE A AFFINITÉ
ANORMALE POUR L'OXYGÈNE : L'HÉMOGLOBINE KOLN.

Président : Monsieur Georges SCHAPIRA, Professeur.

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1970

N°

THESE

Pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

MICHEL COHEN SOLAL

Né le 4 décembre 1943 à Alger (Algérie)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

1970

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA
PATHOLOGIE MOLÉCULAIRE DE L'HÉMOGLOBINE.
A PROPOS D'UNE HÉMOGLOBINE INSTABLE A AFFINITÉ
ANORMALE POUR L'OXYGÈNE : L'HÉMOGLOBINE KOLN.

Président : Monsieur Georges SCHAPIRA, Professeur.

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

18

1871-1872

THÈSE

PAR

DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR M. COHEN-SOLAL

1871

M. COHEN-SOLAL

DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR M. COHEN-SOLAL



EXEMPLAIRE DE LA BIBLIOTHÈQUE

UNIVERSITAIRE DE LEIDEN

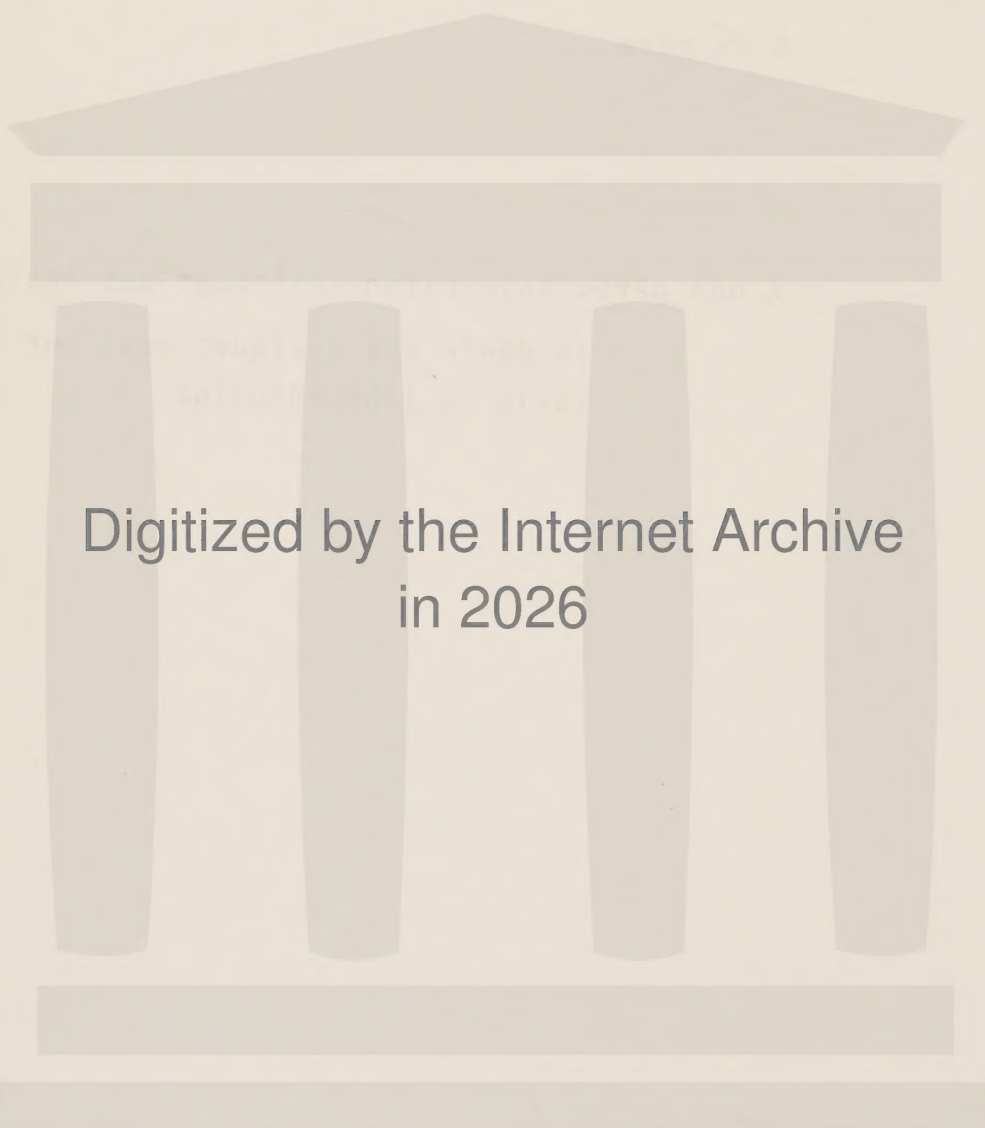
ACQUISITION DE LA BIBLIOTHÈQUE

UNIVERSITAIRE DE LEIDEN

UNIVERSITY OF LEIDEN

A ma mère

A mon père, chirurgien-assistant des hôpitaux
je dédie ces quelques mots sur l'anatomie de l'hémoglobine.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549901_0052

A ma femme

A ma fille

A tous les miens

A Hervé et Floriane GARREAU

A Yves BEUZARD

A tous mes amis

A Monsieur le Professeur Georges SCHAPIRA,

qui nous a accueilli dans son laboratoire,
et nous a fait bénéficier de sa haute compétence dans le domaine de la pathologie moléculaire.

A Mademoiselle le Docteur Dominique LABIE,
Directeur de Recherche à l'INSERM

qui a dirigé notre travail, nous faisant
bénéficier de ses conseils et de sa très grande expérience de la chimie des protéines.

A Monsieur le Professeur Agrégé Jean ROSA,

qui nous a accueilli comme externe au laboratoire de l'Hôpital Saint-Vincent de Paul, a guidé nos premiers pas dans la recherche, et dont l'amitié et les conseils ne nous ont jamais fait défaut, notamment dans la réalisation de ce travail.

A Monsieur le Docteur E. ZUCKERKANDL,
Directeur de Recherche au C.N.R.S.

qui a bien voulu accepter de nous par-
rainer à l'Institut National de la Santé
et de la Recherche Médicale et de nous
conseiller dans notre activité de re-
cherche.

A Monsieur le Professeur Bernard DREYFUS,

qui nous a confié l'étude de sa malade.

A Madame le Docteur Fanny SCHAPIRA,
Maître de Recherche au C.N.R.S.

A Monsieur le Professeur Jean-Claude DREYFUS,

A Monsieur le Professeur Jacques KRUH,

A Josée PAGNIER et à Olga BELKODJA,

A qui nous devons tant.

A tous mes amis chercheurs et techniciens de
l'Institut de Pathologie Moléculaire.

Aux Secrétaires,

A Mademoiselle Irène JEZIORSKI,

sans l'aide de laquelle la bibliographie
de cette thèse eût été impossible.

A mes maîtres de la Faculté de Médecine et dans
les Hôpitaux.

A mes maîtres d'externat;

Pr. Jean CAUCHOIX

Dr. Jacques MICHON

Pr. Gabriel RICHEL

Pr. René FAUVERT

Pr. Agrégé Jean ROSA

A mes maîtres de la Faculté de Sciences.

INTRODUCTION

L'hémoglobine est une des protéines humaines les mieux connues. Les études très nombreuses entreprises depuis plus de 20 ans en ont fait un modèle moléculaire sans égal, expliquant les relations entre la structure et la fonction (57), élucidant entre autres des problèmes de génétique (34), d'évolution phylogénique et ontogénique (36).

Les hémoglobines anormales revêtent un grande importance : tout d'abord en raison du nombre des sujets qui en sont porteurs, mais aussi en raison des déductions que leur étude permet de faire sur la validité du modèle moléculaire.

Parmi les découvertes de ces dernières années, la détermination par PERUTZ de la structure dans l'espace avec une résolution de $2,8 \text{ \AA}$ (58) a apporté une révolution dans la compréhension de la fonction de l'hémoglobine, permettant d'expliquer à l'échelle atomique les données physiologiques.

Le travail que nous présentons a consisté, pour une hémoglobine humaine mutée, entraînant une anémie hémolytique grave, en l'étude de ses propriétés physico-chimiques (stabilité), de sa capacité fonctionnelle (affinité pour l'oxygène, effet Bohr), et de la recherche du siège et du type de la substitution responsable.

Notre méthode d'étude a été entièrement originale, permettant de raccourcir notablement certaines étapes particulièrement complexes. Ce protocole expérimental devrait simplifier dans l'avenir l'étude de la structure primaire d'autres hémoglobines anormales du même type.

LES HEMOGLOBINES HUMAINES NORMALES ET ANORMALES

L'hémoglobine est une hétéroprotéine : elle est constituée par un groupement protéique, la globine, et par un groupement prosthétique, l'hème qui est identique pour toutes les hémoglobines normales ou anormales.

La globine est formée par l'association de quatre chaînes protéiques, identiques deux à deux, et qui contractent entre elles des liaisons très importantes pour le fonctionnement de l'ensemble.

I - STRUCTURE DES HEMOGLOBINES NORMALES

1) L'homme normal adulte possède dans ses globules rouges plusieurs variétés d'hémoglobines :

- l'hémoglobine A_1 , fraction majeure (97 p. 100) est formée par l'association de deux chaînes α et de deux chaînes β : sa formule est $\alpha_2^A \beta_2^A$.

- l'hémoglobine A_2 , ne représente que 1,5 à 2 p. 100 de l'hémoglobine totale ; sa formule est $\alpha_2^A \delta_2^A$, c'est-à-dire qu'elle est constituée de deux chaînes α identiques à celles que l'on trouve dans l'hémoglobine A_1 , et de deux chaînes différentes des chaînes β , les chaînes δ ; cette hémoglobine apparaît chez le sujet normal vers l'âge de six mois.

- d'autres hémoglobines s'observent chez l'adulte (il s'agit de fractions mineures) :

- de l'hémoglobine foetale (moins de 1 p. 100)

- une hémoglobine dite A_3 , qui est de l'hémoglobine A_1 vieillie ayant fixé du glutathion (67).

- une hémoglobine A_{1c} , dont la chaîne β porte à son extrémité N-terminale un groupement complexe (9) ;

2) Les hémoglobines au cours de la vie "in utero"

a) Pendant la période embryonnaire, on retrouve une hémoglobine de formule $\alpha_2\epsilon_2$, nommée Gowers 2, de structure encore mal connue. Cette hémoglobine disparaît chez le fœtus après trois mois ; elle persiste et peut s'observer à la naissance en cas de trisomie D (33).

b) Pendant la période foetale, on retrouve l'hémoglobine F ou foetale, de formule $\alpha_2^A \gamma_2^F$. A la naissance, il y a 75 à 80 p. 100 d'hémoglobine F, le reste étant de la A_1 . Le taux de l'hémoglobine F diminue rapidement, tandis que celui de l'hémoglobine A_1 augmente ; de sorte que vers l'âge de un an, on retrouvera les hémoglobines A_1 et A_2 seules, aux taux observés chez l'adulte.

3) La structure primaire (ou séquence d'enchaînement des acides aminés) des chaînes α , β , γ et δ est parfaitement connue. La chaîne α possède 141 résidus ; les chaînes β , γ et δ 146. (12)(31)(73)(71).

Les séquences de ces quatre chaînes sont assez voisines et comparables à la séquence d'une autre protéine héminique, la myoglobine, ce qui a permis d'avancer un schéma d'évolution phylogénique à l'échelle moléculaire. (36)(82)

4) La structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine a été déterminée par diffraction des rayons X par PERUTZ. (58)(52)(21)(59)

La forme d'une chaîne est globulaire. On peut y distinguer des parties où les résidus sont disposés de façon hélicoïdale (huit hélices nommées de A à H) ; entre ces hélices existent des cassures, ou des zones dans lesquelles les résidus sont disposés linéairement formant des boucles (ces zones sont nommées par les deux lettres des hélices qu'elles séparent).

Les résidus sont repérés par leur situation spatiale selon leur position dans une hélice ou une portion inter-hélicoïdale (par exemple Val β 98 (FG 5) : Valine en position 98 sur la chaîne β , cinquième position de la portion non-hélicoïdale FG, c'est-à-dire entre les hélices F et G).

En surface de la molécule, se trouvent des résidus chargés, ou polaires, hydrophiles ; à l'intérieur, se trouvent des résidus non chargés, ou apolaires, hydrophobes, enfouis du fait du repliement des hélices sur elles-mêmes. L'hème est inséré profondément à l'intérieur de la globine, dans une crêvasse, appelée "poche de l'hème", qui est tapissée de résidus hydrophobes. Celle-ci est très étroite, ne permettant que l'entrée et la sortie d'un atome d'oxygène et empêchant toute pénétration d'eau. L'hème est attaché à la globine par des liaisons de faible énergie : les principales sont des liaisons de coordinance entre l'atome de fer de l'hème et des résidus d'histidine ; de plus, des liaisons

hydrophobes, plus lâches, s'établissent entre les chaînes latérales de l'hème et une vingtaine de résidus.

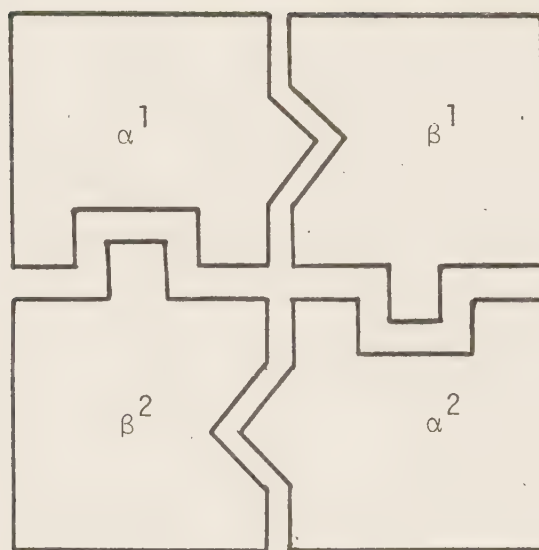
Les deux chaînes α et les deux chaînes β s'imbriquent de façon à réaliser une structure compacte. Les contacts entre deux chaînes de même nature sont insignifiants. Par contre ceux entre chaînes α et β sont essentiels ; il existe deux types de contacts : entre deux sous-unités d'un même dimère $\alpha\beta$, dit $\alpha^1\beta^1$, contact très étendu (39 résidus en contact) donc ferme ; et entre deux dimères différents dit $\alpha^1\beta^2$, moins étendu (19 résidus), plus lâche. (Fig. 1)

(page 8)

Au cours du phénomène de l'oxygénation, PERUTZ a pu montrer des modifications dans la structure spatiale : les deux dimères tournent l'un contre l'autre au niveau de la surface de contact $\alpha^1\beta^2$, la surface $\alpha^1\beta^1$ ne permettant qu'un tout petit mouvement de glissement ; ces modifications de structure s'accompagnent d'un déplacement des hèmes des chaînes (de 5 Å pour les β et de 1 Å pour les α), de sorte qu'à l'état oxygéné l'hémoglobine occupe un volume plus compact qu'à l'état desoxygéné.

Enfin, au centre du tétramère, existe une cavité centrale. PERUTZ (59) a montré son rôle dans l'effet Bohr, et BENESCH (5) son rôle dans la fixation d'un ligand modifiant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, le 2-3 diphospho-glycérate.

Figure 1



Mode d'association (très schématique) des chaînes de l'hémoglobine.

La molécule d'hémoglobine est constituée par l'association de deux chaînes α et de deux β .

Les surfaces d'association entre chaînes sont essentielles :

- leur intégrité est nécessaire à la cohésion et la stabilité de la molécule ;
- la surface de contact entre sous-unités α^1 et β^2 , est essentielle pour assurer la fonction d'oxygénation de l'hémoglobine.

Tous ces résultats ont permis une meilleure compréhension des relations entre la structure et la fonction de la protéine. Ils ont permis aussi de classer les mutants selon le siège spatial sur lequel la mutation porte.

(32)

II - LES HEMOGLOBINES ANORMALES

Les hémoglobines anormales sont responsables de maladies dont la cause est génétique et l'explication moléculaire ; ceci a permis à PAULING d'émettre la notion de "maladie moléculaire" (55).

Les anomalies observées sont de deux types :

- des anomalies quantitatives, maladies s'accompagnant de modifications dans les taux des différentes hémoglobines, la structure de celles-ci étant normale : les thalassémies (79)(27).

- des anomalies qualitatives : il s'agit de modifications de la structure de la globine en rapport avec un changement du patrimoine génétique : la plus fréquente consiste dans le remplacement d'un acide aminé par un autre en une position donnée de la séquence (mutation ponctuelle) ; mais d'autres anomalies peuvent (plus rarement) s'observer : disparition d'un ou de plusieurs acides aminés (délétion), crossing-over.

L'étude de la seule structure primaire de ces hémoglobines mutées, ne permet pas de comprendre pourquoi telle mutation ne se traduit par aucun trouble, et pourquoi une mutation du même type située à un autre endroit est lourde de conséquences. Seule, la référence à la structure

tridimensionnelle de l'hémoglobine permet de montrer pourquoi certaines hémoglobines anormales s'accompagnent de troubles fonctionnels si la mutation porte sur des acides aminés occupant une position clé (57).

Les anomalies de l'hémoglobine, qu'elles soient quantitatives ou qualitatives, se transmettent comme un caractère autosomique mendélien.

La détection d'une hémoglobinopathie se fait principalement par électrophorèse. Cette méthode ne détectera évidemment que les hémoglobines mutées qui ont, du fait de la mutation, une charge globale différente (remplacement d'un acide aminé chargé par un neutre ou inversement, ou d'un résidu chargé par un de charge différente). Compte tenu de toutes les mutations possibles, et de celles qui alors provoqueraient une différence de charge, on peut calculer que la méthode électrophorétique est incapable de détecter 75 p. 100 des anomalies.

On connaît actuellement plus de cent hémoglobines anormales. La nomenclature d'une hémoglobine anormale a tout d'abord été une lettre, puis un lieu géographique. La seule nomenclature valable est la nomenclature chimique : elle précise la chaîne atteinte, le numéro de l'acide aminé muté, sa position spatiale, et la nature de la substitution (par ex., l'hémoglobine S s'écrit : $\alpha_2^A \beta_2^6$ (A3) Glu $\rightarrow$ Val)

1) Les mutations de la surface de la molécule

Ce sont de loin les plus connues, et les plus faciles à détecter, car elles s'accompagnent d'une modification de la charge. Le résidu muté se trouve loin des zones essentielles à la physiologie de la molécule, ce qui explique le peu de signes d'accompagnement (certaines de ces anomalies ont même été trouvées chez des sujets non malades, par ex., lors d'études systématiques de populations).

Dans ce cadre, l'hémoglobine S (responsable de la drépanocytose) occupe une place à part, car la mutation entraîne des troubles graves. Ceci est dû à ce que lors de la désoxygénation l'hémoglobine S forme une sorte de gel, qui modifie les propriétés des globules rouges ; ils deviennent rigides, se déforment (falciformation) et s'agglutinent, obstruant les capillaires ; cette situation est réalisée dans les petits vaisseaux (où la pression partielle en oxygène est faible) ; ainsi s'explique la physio-pathologie des ulcérations des membres inférieurs observées dans la maladie.

L'explication moléculaire du phénomène a été donnée par MURAYAMA (53) ; sous forme désoxygénée, la valine β 6 (résidu muté) crée un pont avec les molécules voisines, aboutissant à une polymérisation fibrillaire très allongée, qui forme le gel dit tactoïde.

2) Les mutations de la poche de l'hème sont responsables :

a) *soit d'une hémoglobine instable*, nous en parlerons avec les autres hémoglobines de ce type,

b) *soit d'une hémoglobine M.*

Le fer de l'hème existe normalement toujours à l'état ferreux divalent. Il est relié à la globine par des liaisons relativement faibles ; les principales de celles-ci s'établissent avec des résidus d'histidine de la globine.

Les mutations portant sur ces résidus renforcent le lien, dont la labilité est essentielle pour le fonctionnement de l'hème. Le fer est alors oxydé en fer ferrique trivalent : l'hémoglobine est transformée en méthémoglobine, qui n'est plus capable d'assurer la fonction d'oxygénation. De telles hémoglobines anormales ne peuvent évidemment s'observer qu'à l'état hétérozygote, la survie étant assurée par la présence de 50 p. 100 d'hémoglobine normale.

Cinq hémoglobines M ont été décrites :

BOSTON α_2^{58} (E7) His $\longrightarrow$ Tyr β_2^A (28)

SASKATOON $\alpha_2^A \beta_2^{68}$ (E7) His $\longrightarrow$ Tyr (28)

IWATE α_2^{87} (F8) His $\longrightarrow$ Tyr β_2^A (49)

HYDE PARK $\alpha_2^A \beta_2^{92}$ (F8) His $\longrightarrow$ Tyr (30)

MILWAUKE $\alpha_2^A \beta_2^{67}$ (E11) Val $\longrightarrow$ Glu (28)

3) Les hémoglobines instables

Il s'agit là d'une classe d'hémoglobinopathies dont la connaissance est récente. Ces hémoglobines ont des propriétés physico-chimiques anormales ; leur durée de vie est de ce fait très réduite ; parfois elles sont détruites avant la sortie du globule rouge de la moëlle. Dans l'hématie, on observe des inclusions (ou corps de Heinz), qui sont formées par de l'hémoglobine anormale précipitée (22). Leur découverte est un élément important pour le diagnostic. Ils sont retrouvés soit spontanément (surtout après splénectomie), soit après traitement des hématies par un réducteur (acétyl-phénylhydrazine). Ceci est dû à ce que la rate sequestre la majorité des corps de Heinz qui alors ne sont pas observés dans le sang circulant (44). Les globules rouges sont fragilisés par ces précipités, ce qui entraîne une anémie hémolytique avec réticulocytose (16). On retrouve parfois dans les urines un pigment noir, qui est un dérivé du métabolisme de l'hème, la mésobilifuscine (75). On pense que ces hémoglobines sont léthales à l'état homozygote en raison de la gravité des troubles qu'elles entraînent.

Assez souvent, ces hémoglobines instables sont dues à une mutation qui ne modifie pas la charge ; elle ne seront pas détectées par électrophorèse, et la seule manière de les déceler est de mettre en évidence "in vitro" l'instabilité.

Une telle anomalie dans les propriétés physico-chimiques de l'hémoglobine peut s'observer dans différentes conditions :

a) *Un changement profond dans la conformation de la molécule.*

- Une première possibilité est le remplacement d'un résidu situé au coeur même de la protéine, donc qui est hydrophobe, par un résidu hydrophile ; celui-ci aura alors tendance, du fait de son hydrophilie, à se placer en surface, bouleversant tout l'édifice de la molécule. Par exemple, dans l'hémoglobine Wien $\alpha_2^A \beta_2^{130}$ (H8) Tyr $\longrightarrow$ Arg (60) l'apparition du résidu d'arginine polaire (chargé) est responsable de l'instabilité de l'hémoglobine et d'une très grave anémie hémolytique.

- Une autre possibilité est la cassure d'une hélice par apparition d'un résidu supplémentaire de proline, acide aminé qui ne peut s'y intégrer.

Nous citerons (entre autres) les hémoglobines :

BIBBA α_2^{136} (H19) Leu $\longrightarrow$ Pro β_2^A (43)

SABINE $\alpha_2^A \beta_2^{91}$ (F7) Leu $\longrightarrow$ Pro (70)

b) *Une tendance à la méthémoglobinisation (associée ou non à un blocage des groupes thiols), ou une tendance à la déshéminisation peuvent être responsable d'une instabilité.*

Les mutations portant sur les résidus de la poche de l'hème sont responsables de telles anomalies ; en général, on observe en outre des modifications de la fonction d'oxygénation.

Dans ce cadre, nous citerons :

- l'hémoglobine I Toulouse $\alpha_2^A \beta_2^{66}$ (E10) Lys $\longrightarrow$ Glu (68)

où la disparition d'une liaison entre le résidu $\beta 66$ et un acide propionique de l'hème provoque une méthémoglobinisation, une tendance à la perte de l'hème, et une instabilité mais celle-ci n'est observée qu'"in vitro".

- l'hémoglobine Hammersmith $\alpha_2^A \beta_2^{42}$ (CD1) Phe $\longrightarrow$ Ser (23)

où une volumineuse phénylalanine est remplacée par une petite sérine ce qui modifie les rapports dans la poche de l'hème, et provoque alors instabilité, et modification de la fixation d'oxygène (diminution).

- l'hémoglobine Köln $\alpha_2^A \beta_2^{98}$ (FG5) Val $\longrightarrow$ Met (17), nous y reviendrons.

c) Enfin, une hémoglobine ayant *tendance à se dissocier* présentera une instabilité.

La cohésion du tétramère de l'hémoglobine étant assurée grâce aux surfaces de contact, les mutations portant sur celles-ci seront responsables d'un tel trouble. La mutation peut survenir soit sur le contact $\alpha^1 \beta^1$, ce qui, en raison de la fermeté de celui-ci causera une instabilité,

soit sur le contact $\alpha^1 \beta^2$, ce qui entraînera en outre des troubles importants de l'oxygénation.

Parmi les hémoglobines mutées sur le contact $\alpha^1 \beta^1$ nous citerons les hémoglobines Philly $\alpha_2^A \beta_2^{35}$ (C1) Tyr $\longrightarrow$ Phe (65), mutation qui coupe un pont hydrogène important et aboutit à des monomères ; et l'hémoglobine Tacoma $\alpha_2^A \beta^{30}$ (B 12) Arg $\longrightarrow$ Ser (13). Nous reviendrons sur les mutants du contact $\alpha^1 \beta^2$ parmi les hémoglobines à affinité anormale pour l'oxygène.

4) Les autres types de mutations

a) Nous parlerons des *mutants de la cavité centrale* avec les hémoglobines à affinité anormale pour l'oxygène.

b) On connaît actuellement trois cas de délétion : les hémoglobines Leiden $\alpha_2^A \beta_2^6$ ou 7 (A3 ou 4) Glu délété (42) et Freiburg $\alpha_2^A \beta_2^{23}$ (B5) Val délétée (40), qui rompent respectivement les hélices A et B, et de ce fait s'accompagneront d'instabilité ; l'hémoglobine Gun Hill (64) est due à la délétion de 5 acides aminés (β 91 à 95 sur l'hélice F et le segment FG), ce qui modifie la zone d'attachement de l'hème (étant donné l'absence de l'histidine impliquée dans ce lien, la chaîne β ne porte pas d'hème) et modifie considérablement la zone de contact $\alpha^1 \beta^2$, ce qui se traduit par une instabilité (11).

c) *Un crossing-over* entre les gènes β et δ a été décrit pour l'hémoglobine Lepore (2)(47) ; il s'agit d'une hémoglobine contenant une chaîne dont le début est de caractère δ et la fin β .

III - FONCTION DE L'HEMOGLOBINE

LES HEMOGLOBINES A AFFINITE MODIFIEE POUR L'OXYGENE

Constituant principal du globule rouge, l'hémoglobine assure le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus périphériques.

1) La fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine n'obéit pas à une loi simple (fig. 2) (page 20).

Ceci est dû au fait que l'hémoglobine est une protéine allostérique, et sa physiologie suit (tout au moins en première approximation) les prévisions et les équations du modèle de MONOD, WYMAN et CHANGEUX (50) (51).

Ce modèle implique :

- que la courbe sigmoïde est en rapport avec la structure tétramérique de la protéine, constituée par quatre chaînes deux à deux différentes. Une chaîne isolée, comme cela existe chez les animaux inférieurs (lamproie), ou un tétramère anormal (hémoglobine H, de structure β_4), n'aura pas une courbe sigmoïde, mais hyperbolique ; de même que la myoglobine qui n'est constituée que d'une chaîne.

- ceci est en rapport avec le phénomène de "coopérativité" c'est-à-dire que la fixation d'un atome d'oxygène sur un hème du tétramère facilite la fixation de l'oxygène sur les autres. Ce fait peut être mesuré en étudiant la

Figure 2



Courbes d'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Cellules entières normales à pH 7,13 (1), pH 7,49 (2), pH 6,42 (3).

On remarquera :

- la forme sigmoïde des courbes, témoin des interactions allostériques de l'hémoglobine.
- l'effet de la modification du pH sur l'affinité (Effet Bohr).

"sigmoïdité" de la courbe de fixation d'oxygène grâce à la pente de l'équation de Hill, le $\bar{n}$ de Hill.

- Le passage de la forme desoxy à la forme oxyhémoglobine doit s'accompagner de modifications de structure spatiale de la protéine ; ce fait a été prouvé par les études de PERUTZ (58).

- Enfin, le modèle prévoit l'existence de mutants qui n'ont plus d'interactions allostériques du fait de l'empêchement de ces mouvements à l'intérieur de la protéine ; leur courbe de fixation d'oxygène sera en conséquence hyperbolique.

2) Dans le globule rouge le 2-3 diphosphoglycérate (2-3 DPG), diminue l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène comme cela a été récemment montré par BENESCH (5).

Certains troubles des enzymes du globule rouge modifient la concentration cellulaire du 2-3 DPG, et par conséquent l'affinité de l'oxygène. L'exemple le plus courant est le déficit en pyruvate-kinase (24) (dernier enzyme de la glycolyse anaérobie) ce qui a pour effet d'accumuler tous les intermédiaires de la voie chimique, dont le 2-3 DPG.

Les globules rouges foetaux ont une affinité augmentée pour l'oxygène ; le 2-3 DPG s'y trouve en concentration égale à celle de globules rouges adultes ; mais la fixation du 2-3 DPG est diminuée pour l'hémoglobine F. L'explication de ce fait a été donnée par l'étude de l'hémoglobine

Hiroshima $\alpha_2^A \beta_2^{143}$ (H21) His $\longrightarrow$ Asp (29), dont les caractères sont identiques à ceux de l'hémoglobine F. Le remplacement de l'histidine β 143 par un aspartique dans l'hémoglobine Hiroshima, et une sérine dans la chaîne γ empêche la fixation du 2-3 DPG sur la molécule. Ce résidu fait partie de la cavité centrale (58), ce qui prouve le rôle de cette région de la molécule pour la régulation de la physiologie de l'hémoglobine.

3) Cette même région est essentielle pour une autre propriété de l'hémoglobine : l'effet Bohr, c'est-à-dire la modification de l'affinité pour l'oxygène avec le pH (59) ; c'est pourquoi l'hémoglobine Hiroshima a un effet Bohr très diminué (56).

4) Les hémoglobines à affinité anormale pour l'oxygène

a) Nous avons déjà dit que les mutants de la poche de l'hème s'accompagnaient de modifications dans l'affinité pour l'oxygène.

b) Cependant la région la plus importante pour la fonction d'oxygénation est le contact $\alpha^1 \beta^2$ (58) ; toute modification de cette région entravant les mouvements des sous-unités, empêchera les interactions allostériques, donc affectera la coopérativité et la forme de la courbe d'affinité pour l'oxygène.

α) Les hémoglobines à affinité augmentée pour l'oxygène :

Outre l'hémoglobine Hiroshima (29) dont les troubles d'affinité sont en rapport avec la non-fixation du 2-3 DPG six hémoglobines mutées sur le contact $\alpha^1 \beta^2$ ont été décrites : l'hémoglobine Köln $\alpha_2^A \beta_2^{98}$ (FG5) Val $\longrightarrow$ Met (17) en est l'exemple le plus typique : l'apparition d'une méthionine, résidu beaucoup plus gros que la valine empêche les mouvements dans le contact $\alpha^1 \beta^2$ et de ce fait l'hémoglobine anormale a une courbe d'affinité hyperbolique. Le résidu β 98 ayant une liaison avec l'hème, liaison qui est détruite par la mutation, l'hémoglobine aura tendance à se déshéminiser, ce qui crée une raison de plus à l'instabilité observée.

Les troubles de la fixation d'oxygène entravent gravement la physiologie de la molécule ; à forte pression partielle en oxygène (au niveau des poumons) l'hémoglobine peut fixer l'oxygène ; quand la pression partielle en oxygène diminue, ce qui se passe au niveau des tissus périphériques, elle ne peut plus relâcher l'oxygène fixé. Le sujet atteint d'une telle hémoglobine anormale possède donc une protéine non fonctionnelle.

Les autres hémoglobines de ce type, par un mécanisme analogue, offrent à des degrés variables des modifications semblables. Il s'agit des hémoglobines :

CHESAPEAKE α_2^{92} (FG4) Arg $\longrightarrow$ Leu β_2^A (54)

J. CAPETOWN α_2^{92} (FG4) Arg $\longrightarrow$ Gln β_2^A (10)

YAKINA $\alpha_2^A \beta_2^{99}$ (G1) Asp $\longrightarrow$ His (41)

KEMPSEY $\alpha_2^A \beta_2^{99}$ (G1) Asp $\longrightarrow$ Asn (63)

Une sixième hémoglobine anormale, l'hémoglobine Rainier $\alpha_2^A \beta_2^{145}$ (HC2) Tyr $\longrightarrow$ His (78), se rattache au même groupe, car la tyrosine β 145 a un lien avec la Val β 98 (FG5) (du contact $\alpha^1 \beta^2$), lien qui ne peut se former avec l'histidine.

β) On ne connaît actuellement qu'une seule hémoglobine anormale dont *l'affinité pour l'oxygène est diminuée*. Il s'agit de l'hémoglobine Kansas $\alpha_2^A \beta_2^{102}$ (G4) Asn $\longrightarrow$ Thr (8)

c) Dans un certain nombre de ces hémoglobines anormales à affinité augmentée pour l'oxygène, on observe une polyglobulie : l'incapacité de l'hémoglobine pathologique à relâcher son oxygène au niveau des tissus provoque une sécrétion d'érythropoïétine secondaire à l'anoxie (63)(29).

TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DE L'HEMOGLOBINE KÖLN

GENERALITES

L'étude de la structure d'une hémoglobine anormale, c'est-à-dire la détermination de sa structure primaire (enchaînement des acides aminés constitutifs des chaînes protéiques) fait appel à un certain nombre de techniques de la chimie des protéines. Il s'agit là de techniques longues, nécessitant un appareillage complexe, qui ne peuvent être entreprises que par des laboratoires très spécialisés.

Compte tenu du fait qu'elles s'appliquent à des sujets parfois gravement anémiés, que la fraction anormale est bien souvent en pourcentage très faible, elles doivent être miniaturisées à l'extrême et automatisées (car elles porteront sur des quantités de protéine de l'ordre de la dizaine ou la vingtaine de milligrammes).

I - PREPARATION DE L'HEMOLYSAT

1) Le sang est prélevé par ponction veineuse sur anticoagulant (milieu A.C.D., ou héparine), et immédiatement conservé dans de la glace.

2) Préparation de l'hémolysat

Elle est pratiquée selon une adaptation de la technique de DRABKIN (26).

Le sang est centrifugé à 2 000 g au froid ; puis le culot globulaire lavé trois fois par une solution isotonique de chlorure de sodium ; l'hémolyse est obtenue par choc osmotique grâce à deux volumes d'eau distillée froide ; après 30 minutes d'attente, les débris membranaires sont éliminés par 60 minutes d'ultra-centrifugation à 105 000 g, et une solution limpide d'hémoglobine est recueillie.

Dans cette préparation, nous n'avons pas utilisé de toluène, bien que celui-ci en solubilisant les lipides membranaires favorise l'extraction de l'hémoglobine ; en effet, d'après FESSAS et LOUKOPOULOS (communication personnelle), le toluène exclut les chaînes α libres et les hémoglobines instables de l'hémolysat.

3) La concentration de la solution d'hémoglobine obtenue a été déterminée spectrophotométriquement à 540 m μ après conversion de l'hémoglobine en cyanméthémoglobine (81) (ϵ M à 540 m μ = 11.10^3 /hème).

4) Conservation-

L'hémolysat est conservé au froid, à l'obscurité complète, pendant le minimum de temps, la fraction anormale instable commençant à précipiter spontanément à partir du 4ème jour.

II - DECOUVERTE D'UN CONSTITUANT ANORMAL

1) Par électrophorèse sur différents supports

a) *Sur gel d'amidon*

La technique utilisée est une adaptation de celle de SMITHIES (76) : électrophorèse horizontale sur gel d'amidon de maïs hydrolysé, en tampon Tris-EDTA-Borate- pH 8,6.

Le gel est coulé sur une plaque de plexiglas de 21 x 13 x 0,8 cm ; le dépôt est effectué à 7 centimètres de la cathode par insertion d'un morceau de papier Whatmann 3 MM imbibé de la solution d'hémoglobine à 6 p. 100 ; la migration dans un champ électrique de 500 volts et de 50 mA d'intensité, effectuée au froid, dure 2 h 30 à 3 heures.

Le gel est ensuite découpé en deux parties selon l'épaisseur ; la moitié supérieure est colorée à l'amido-Schwartz, colorant non spécifique des protéines ; la moitié inférieure est colorée par la tolidine, utilisant la propriété pseudo-peroxydasique de l'hémoglobine, visualisant mieux les bandes mineures.

b) *Sur acétate de cellulose*

Il s'agit là de l'adaptation de la technique précédente à des bandes de 10 x 4 cm : 1 μ l de la solution d'hémoglobine à 5 p. 100 est déposé à 3 cm de la cathode ; la migration est effectuée à température du laboratoire, dans un champ électrique de 120 volts, de 2 mA d'intensité, pendant 1 h 30 ; la bande est ensuite colorée soit à l'amido-Schwartz, soit à la tolidine.

Outre une meilleure résolution des bandes les plus cathodiques, cette technique présente, par rapport à celle sur gel d'amidon, deux avantages supplémentaires : par un traitement simple (bain de diacétone-alcool, puis chauffage à 60°C) la bande est séchée et rendue transparente ce qui en permet une conservation indéfinie ; une fois colorée, la bande peut être aussi découpée, et après dissolution complète par de l'acide acétique à 50 p. 100, les fractions sont dosées par mesure de la densité optique à 630 m μ .

2) Par différents tests de stabilité

Les hémoglobines instables présentent la propriété de précipiter dans des conditions physico-chimiques qui normalement ne font pas précipiter une hémoglobine normale.

Si les techniques électrophorétiques sont utilisées depuis une vingtaine d'années, et sont actuellement parfaitement bien codifiées, il n'en est pas de même pour les tests

de stabilité : ceux-ci sont utilisés depuis peu, et leur découverte est généralement fortuite et empirique.

Pour détecter l'instabilité, il existe toute une série de tests. Aucun n'a une spécificité absolue, aussi plusieurs tests sont utilisés.

a) *Stabilité thermique* (d'après DACIE) (22)

Il s'agit là du test de découverte la plus ancienne. La solution d'hémoglobine, diluée à 1 p. 100 par une solution de phosphate de sodium 0,01 M pH 7,0 est incubée à 50°C pendant deux heures.

Ce temps a été choisi parce qu'il correspond sur une cinétique de dénaturation thermique de l'hémoglobine normale à un point critique. L'hémoglobine normale n'est donc pas affectée par ce traitement, alors qu'une hémoglobine instable précipite à partir de la vingtième minute..

Parallèlement à la solution d'hémoglobine suspecte, on traite de façon analogue une solution d'hémoglobine connue comme normale et stable.

Après l'incubation, la solution est centrifugée. La détermination approximative du pourcentage de l'hémoglobine qui a précipité est faite par dosage comparatif entre le surnageant de la solution chauffée et une aliquote de la solution d'hémoglobine non chauffée. Ce dosage permet de ne pas confondre le léger précipité normal des protéines non

hémoglobiques du globule rouge avec celui d'une hémoglobine instable.

b) *Action de défécants* (d'après LEHMANN et DACIE) (23)

C'est le test le plus empirique, et le moins spécifique : après 24 heures à température du laboratoire, le mélange volume à volume de la solution d'hémoglobine à 10 p. 100, de tampon phosphate de sodium 0,1 M - pH 7,4, et d'une solution de chlorure de zinc 0,01 M, provoque la précipitation du constituant anormal.

c) *Action du para-hydroxy-mercuri-benzoate (PMB)* (réactif des groupes thiols des protéines).

Ce type d'instabilité résulte des observations de JACOBS (37) et de HUEHNS (communication personnelle).

La technique utilisée est inspirée de celle décrite par BUCCI (14) (15) et ROSEMEYER et HUEHNS (69) pour la dissociation des chaînes de l'hémoglobine.

La solution d'hémoglobine, diluée à 2 p. 100 par une solution de phosphate de potassium 0,02 M est incubée à + 4°C avec du PMB dans un rapport stoechiométrique 1/8. La force ionique du milieu est amenée à $\mu = 0,1$ par du chlorure de sodium, et le pH ajusté à 6,0.

Après 16 heures d'incubation au froid, on note un précipité pour une hémoglobine instable, alors que pour une hémoglobine normale les chaînes sont dissociées, mais solubles.

d) *D'autres tests peuvent encore être utilisés :*

- action des réactifs des groupes thiols des protéines autres que le PMB.
- augmentation ou diminution de la force ionique du milieu.
- abaissement du pH de la solution dans des conditions limites permettant d'obtenir la dissociation des chaînes sans atteindre un pH dénaturant (premier temps de la technique d'hybridation des chaînes de l'hémoglobine) (46).

III - ETUDE DE LA FONCTION DE L'HEMOGLOBINE : FIXATION D'OXYGENE.

Celle-ci a été effectuée selon la technique de HUEHNS et BELLINGHAM (4) sur suspension de cellules entières, technique adaptée de celle décrite par BENESCH sur l'hémoly-sat (6).

Immédiatement après le prélèvement, le culot globulaire abondamment lavé, est resuspendu dans un tampon phosphate isotonique de pH 7,13 - 7,49 ou 6,46. 4 ou 5 ml de cette suspension sont introduits dans un tonomètre de 70 à 75 ml. Celui-ci est constitué par une cuve optique de 4 ml et 1 cm de trajet optique, surmontée par une ampoule fermée hermétiquement par un rodage mobile, permettant ainsi l'établissement de pressions variables selon les quantités d'air qu'on y introduit.

Le spectre de l'hémoglobine est étudié "in situ" dans les globules rouges, grâce à un spectrophotomètre enregistreur non influencé par l'effet Tyndall (UNICAM-SP 800).

L'hémoglobine est désoxygénée par un vide poussé répété à trois reprises en alternant avec une équilibration à 37°C. La désoxygénation totale de l'hémoglobine est vérifiée spectrophotométriquement : maximum d'adsorption à 555-560 m μ et méplat sur le versant des grandes longueurs d'onde ; ainsi que l'absence de méthémoglobine : pas d'absorption à 630 m μ .

On procède ensuite à des entrées d'air contrôlées, suivies chaque fois par une équilibration à 37°C, et d'un enregistrement du spectre. On assiste progressivement à la disparition du maximum à 555 m μ de la désoxyhémoglobine, et à l'apparition de ceux de l'oxyhémoglobine à 541 et 578 m μ , toutes les courbes se recoupant en deux points isobestiques. Enfin un dernier tracé de référence est donné par l'hémoglobine totalement réoxygénée.

A partir des données expérimentales, et grâce à un calculateur électronique (Programma 101 - Olivetti), on calcule d'après BENESCH (6) pour chaque entrée d'air :

- la valeur de la pression partielle en oxygène (pO_2), en tenant compte d'un grand nombre de paramètres : volume du tonomètre, pression atmosphérique, pression de vapeur saturante, humidité relative, température de l'air, température du bain-marie d'équilibration, pourcentage d'oxygène dans l'air

- le pourcentage d'oxyhémoglobine obtenu est calculé à partir des modifications spectrales à 560 et 578 m μ .

On trace alors la courbe du pourcentage d'oxyhémoglobine en fonction de la pO₂. Grâce au calcul de la pente de la droite décrivant l'équation de Hill, on détermine le coefficient de Hill $\bar{n}$.

L'effet Bohr est évalué en comparant la variation du logarithme de la pO₂ pour laquelle 50 p. 100 de l'hémoglobine est saturée (p 50) à la variation du pH du tampon dans lequel les cellules ont été suspendues.

IV - ISOLEMENT DU CONSTITUANT ANORMAL

L'hémoglobine anormale étudiée présentant à la fois une différence de charge et une instabilité par rapport au constituant normal stable, chacune de ces deux propriétés a été exploitée :

1) Méthodes préparatives utilisant la différence de charge.

a) *Electrophorèse préparative*, sur grains d'amidon de maïs en tampon véronal 0,05 M de pH 8,6 ou 9,0, variante de la technique de KUNKEL (45).

b) *Chromatographie sur dextran substitué échangeur d'anions* (DEAE-Séphadex A50 en milieu Tris - HCl - 0,05 M et gradient de pH décroissant modulé grâce à un varigrad à 9 chambres, selon la technique de HUISMAN et DOZY (25)).

2) Méthodes préparatives utilisant les différences de stabilité.

a) Avant de pratiquer les techniques de dénaturation faisant précipiter l'hémoglobine anormale instable, il a été d'abord nécessaire d'éliminer les protéines non hémoglobiniques du globule rouge ; celles-ci, en effet, bien qu'en assez faible concentration dans l'hémolysat coprécipitent avec la fraction instable, et contaminent la préparation.

Cette première étape de purification a été effectuée, toujours à + 4°C, par passage de la solution d'hémoglobine sur CM-Séphadex A50 équilibré par du tampon phosphate 0,01 M pH 6,5 (80). Le CM-Séphadex, dextran substitué échangeur de cations fixe à ce pH l'hémoglobine, mais pas les protéines non hémoglobiniques dont le pHi est beaucoup plus bas et de ce fait ne s'accrochent pas sur la résine.

Après lavage abondant, et vérification de l'absence d'absorption à 280 mμ, l'hémoglobine est décrochée du CM-Séphadex, toujours à + 4°C, par un tampon de molarité beaucoup plus élevée (solution de phosphate disodique 0,2 M).

L'hémoglobine est alors en solution très diluée, et de force ionique élevée.

b) Pour pouvoir pratiquer les dénaturations, il faut alors :

- concentrer l'hémoglobine (par dialyse-concentration sous vide ou par ultra-filtration (membrane Amicon PM 30), méthode beaucoup plus rapide, mais plus dénaturante).

- et désioniser (par dialyse ou par passage sur colonne de Biogel P2 séparant l'hémoglobine exclue des ions salins inclus).

c) Ces opérations préalables effectuées, la fraction anormale a été préparée par précipitation. Il s'agit de l'application quantitative des tests qualitatifs déjà décrits.

Les précipités obtenus ont été lavés abondamment pour éliminer les ions, ceux-ci risquant d'interférer dans les étapes suivantes de la préparation.

3) Toutes les étapes de préparation effectuées depuis le prélèvement jusqu'à l'obtention de ces précipités ont dû être pratiquées très rapidement, avant la précipitation spontanée de la fraction instable, c'est-à-dire en moins de cinq jours.

V - RECHERCHE DU SIEGE DE LA SUBSTITUTION

1) Préparation de la globine

Elle a été effectuée grâce à une technique dérivée de celle de ANSON et MIRSKY (1).

Le précipité resuspendu dans un peu d'eau, est introduit très lentement à raison de 1 mg par ml dans une solution d'acétone-chlorhydrique (acétone distillée 97 ml -

HCl 2N 3 ml) maintenue entre -15 et -20°C par un mélange glace-sel.

Au bout d'une heure ou deux (l'hémoglobine se déshémolinisant difficilement), temps pendant lequel la solution est agitée et la température maintenue à -20°C, l'hémine se détache de la globine et reste soluble, tandis que la globine précipite dans l'acétone.

Celle-ci, recueillie par centrifugation, est lavée trois fois par de l'acétone froid, puis lyophilisée.

Elle est conservée à + 4°C.

2) Les chaînes α et β de la globine ont été séparées :

a) soit de façon qualitative par électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 8,0, en milieu urée 8 M et β -mercapto-éthanol (20).

b) soit de manière préparative par chromatographie sur CM-cellulose, en milieu urée 8 M, β -mercapto-éthanol 0,05 M, pH 6,9 et gradient linéaire de force ionique de phosphate de sodium (0,007 à 0,035 M) (18).

3) Régénération des groupes thiols du précipité-PMB par le β -mercapto-éthanol.

En vue de l'amino-éthylation des résidus de cystéine de la globine, il a été nécessaire de régénérer les groupes thiols qui avaient fixé le mercuri-benzoate.

Pour obtenir ceci, la globine a été dissoute dans une solution contenant du β -mercapto-éthanol à une concentration telle que la compétition d'action du PMB pour les groupes thiols de la globine et le groupe thiol du β -mercapto-éthanol soit en faveur de ce dernier.

En milieu tamponné par du tampon Tris - HCl - pH 8,6, en présence d'EDTA, à l'abri de l'oxygène par bullage continu d'azote dans la solution (pour éviter la formation d'acide cystéique), à température du laboratoire, la globine a été incubée pendant 1 h 30 en présence de β -mercapto-éthanol 10 fois molaire par rapport à la molarité des groupes thiols de la protéine.

Puis la globine a été dialysée contre du tampon Tris-HCl - EDTA - pH 8,6, toujours à l'abri de l'oxygène de façon à éliminer le β -mercapto-éthanol en excès et le composé β -mercapto-éthanol-mercuri-benzoate.

4) Amino-éthylation des cystéines de la globine

Pour obtenir une hydrolyse totale de la globine par la trypsine, l'alkylation des groupes thiols des cystéines de la protéine est nécessaire. Sans cette réaction chimique préalable, ceux-ci forment des ponts di-sulfures, qui isolent une grande portion de protéine que la trypsine ne peut attaquer et qui est insoluble en milieu acide, réalisant un abondant "core". En outre, les résidus de cystéine sont transformés en S-amino-éthyl-cystéine, dont la structure ressemble à celle de la

lysine, ce qui crée un point de clivage supplémentaire à l'enzyme (62).

La technique employée est dérivée de celle de RATHERY et COLE (62). En milieu dénaturant (urée - 8 M), en présence d'EDTA, et d'un réducteur (β -mercapto-éthanol), à pH 8,6 tamponné par un tampon Tris - HCl, à l'abri de l'oxygène de l'air (sous atmosphère d'azote), à température ordinaire, on fait agir de l'éthylène-imine sur la globine pendant 30 minutes à une concentration deux fois molaire par rapport à la molarité d'un groupe thiol de la protéine. La réaction est arrêtée par abaissement du pH à 3,0 ; la protéine alkylée est désionisée par chromatographie sur colonne de Séphadex G 25 éluee par de l'acide formique 0,5 p. 100. Elle est ensuite lyophilisée.

5) Hydrolyse trypsique

Elle a été effectuée selon la technique de INGRAM (35), modifiée par BAGLIONI (3).

Celle-ci est pratiquée à température du laboratoire, en milieu tamponné à 8,4 par de la triméthylamine à 2 p. 100, avec un rapport trypsine-protéine de 1 à 100, pendant une période de 2 à 4 heures. L'hydrolyse est arrêtée par abaissement du pH à 6,4 par de l'HCl - 0,1N. Après centrifugation, le surnageant est soit évaporé, soit lyophilisé ; il est conservé à -20°C.

La trypsine est une endopeptidase qui clive la chaîne polypeptidique au niveau des résidus basiques (lysine, arginine, et S-AE-cystéine) ; ceci permet d'obtenir des peptides parfaitement bien déterminés.

6) "Finger-prints"

Ils sont été pratiqués sur couche mince de cellulose de 20 x 20 cm, adaptation en micro-technique analytique de la technique préparative sur papier de INGRAM (35).

On pratique une électrophorèse selon une dimension en tampon pyridine-acide acétique pH 6,4, puis selon la seconde dimension une chromatographie ascendante en milieu alcool iso-amylque/pyridine/eau (35 : 35 : 27).

La localisation des peptides est faite par coloration à la ninhydrine.

7) Fractionnement des peptides

Le fractionnement des peptides est effectué par chromatographie sur colonne de résines polystyréniques à réticulation vinyl-benzénique échangeuses d'ions.

a) Une première séparation est obtenue par chromatographie sur résine Beckman PA 35 (échangeuse de cations, 8 p. 100 réticulée) et élution par un gradient linéaire de pH (3,1 à 5,0) et de molarité (0,2 à 2 M) en tampon pyridine-acide acétique selon JONES (38)(39).

La détection des peptides est effectuée grâce à un montage entièrement automatisé réalisé d'après celui de

JONES (38) ; une fraction de l'effluent de la colonne est colorée à la ninhydrine, et la densité optique à 570 m μ enregistrée de façon continue.

Cette première chromatographie fournit un profil d'élution (qualitatif) parfaitement reproductible.

b) Les peptides obtenus par cette première chromatographie doivent être purifiés par une seconde chromatographie, certains peptides nécessitant même plusieurs purifications successives pour être obtenus à l'état pur.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- soit chromatographie sur une autre résine échangeuse de cations de réticulation plus faible (4 ou 2 p. 100) éluée en tampon pyridine-acide acétique et gradient identique, ou étalé dans certaines zones (39),

- soit chromatographie sur résine échangeuse d'anions (AG 1 x 2) éluée par un gradient de pH décroissant en tampon N-éthyl-morpholine/ α -picoline/pyridine/acide acétique/eau (72).

- soit filtration moléculaire sur Séphadex G 15 et Biogel P 4 en série (7).

8) Hydrolyse chlorhydrique

Elle est effectuée en tube scellé sous vide partiel à 110°C, pendant 22 heures (dans certains cas l'hydrolyse est poursuivie 48 ou 72 heures), par de l'acide chlorhydrique 6 N contenant 0,009 p. 100 de phénol.

9) La composition en acides aminés des peptides (ou des protéines) hydrolysés a été déterminée :

- soit grâce à l'auto-analyseur Beckman 120 C, selon la technique de MOORE et STEIN (77), avec deux colonnes, une pour les acides aminés basiques, l'autre pour les acides aminés acides et neutres.

- soit grâce à l'auto-analyseur Technicon, avec une seule colonne, éluée par un gradient de molarité et de pH en tampon citrate de sodium, selon PIEZ et MORRIS (61) adapté en micro-méthode par ROBIN (66).

DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE KÖLN

OBSERVATION CLINIQUE

Madame P....., âgée de 50 ans, a été examinée dans le service d'hématologie de l'Hôpital de Bobigny (Professeur Bernard DREYFUS) à la suite d'un syndrome hémolytique discret, avec ictère.

L'interrogatoire permet de retrouver des épisodes semblables parfaitement bien tolérés depuis l'enfance, et la notion d'un sub-ictère familial.

L'examen clinique retrouve une grosse rate, et une fatigabilité anormale. Il n'y a pas d'urines noires.

L'examen hématologique, pratiqué lors de la poussée, a montré une anémie discrète ($3\,280\,000$ hématies/mm³), normochrome, peu réticulocytaire (0,4 p. 100 soit 13 000) ; et le frottis sanguin a permis de retrouver quelques inclusions érythrocytaires spontanément, et dans toutes les cellules

RESULTATS DES TECHNIQUES ENTREPRISES POUR L'ETUDE FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DE L'HEMOGLOBINE KÖLN

I - L'électrophorèse de l'hémolysat a montré :

1) sur gel d'amidon, un constituant anormal, un peu diffus, migrant légèrement en avant de l'hémoglobine A₂.

2) sur acétate de cellulose, outre ce constituant anormal représentant 10 p. 100 de l'hémoglobine totale, on a observé un constituant mineur migrant très lentement : de la chaîne α libre (fig. 3) (page 45).

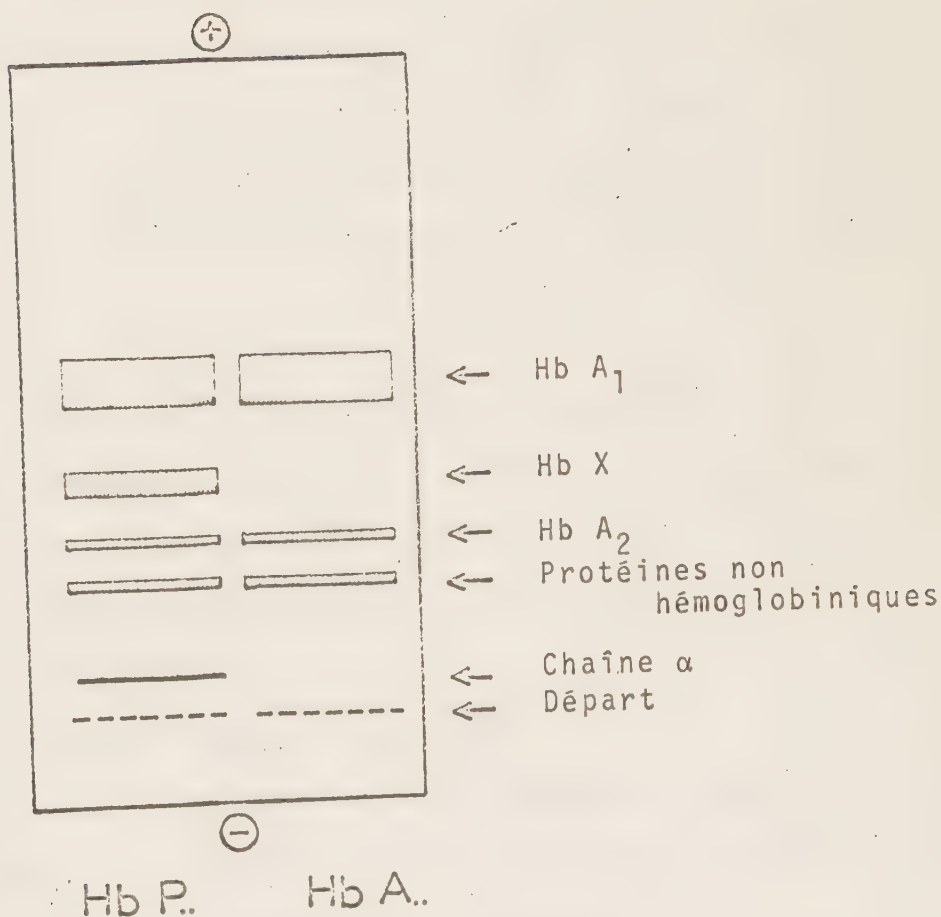
II - L'étude du comportement physico-chimique de cette hémoglobine a été faite par différentes épreuves, qui ont révélé son comportement anormal par rapport à une hémoglobine normale traitée parallèlement :

1) Le chauffage à 50°C a provoqué une précipitation importante commençant au bout de 20 minutes, maximum au bout de 2 heures.

2) L'incubation avec du chlorure de zinc a montré une précipitation, mais beaucoup moins marquée.

3) Après incubation avec du PMB, on a noté un énorme précipité. L'électrophorèse du surnageant a montré que les chaînes de l'hémoglobine étaient dissociées. Il y avait un excès de chaînes α par rapport aux β ; ce qui laissait à penser que la chaîne β mutée avait précipité.

Figure 3



Electrophorèse sur acétate de cellulose en tampon Tris-EDTA-Borate pH 8,6 de l'hémoglobine anormale (à gauche), et d'un témoin normal (à droite). Coloration à l'amido-Schwartz.

On remarque :

- une bande anormale, un peu diffuse, en avant de l'hémoglobine A₂, représentant 12 p. 100 de l'hémoglobine totale
- une bande très cathodique, de la chaîne α libre.

La composition en acides aminés du précipité a montré qu'il s'agissait effectivement d'une chaîne β pratiquement pure (10,8 résidus aspartiques, alors qu'il y en a 5 dans la chaîne α et 11 dans la β (Tableau I) (page 49).

4) Les autres tests de stabilité n'ont pas provoqué de précipitation, en particulier l'abaissement du pH de la solution à 4,7, pH qui dissocie les chaînes de l'hémoglobine.

III - Etude de la fonction de l'hémoglobine

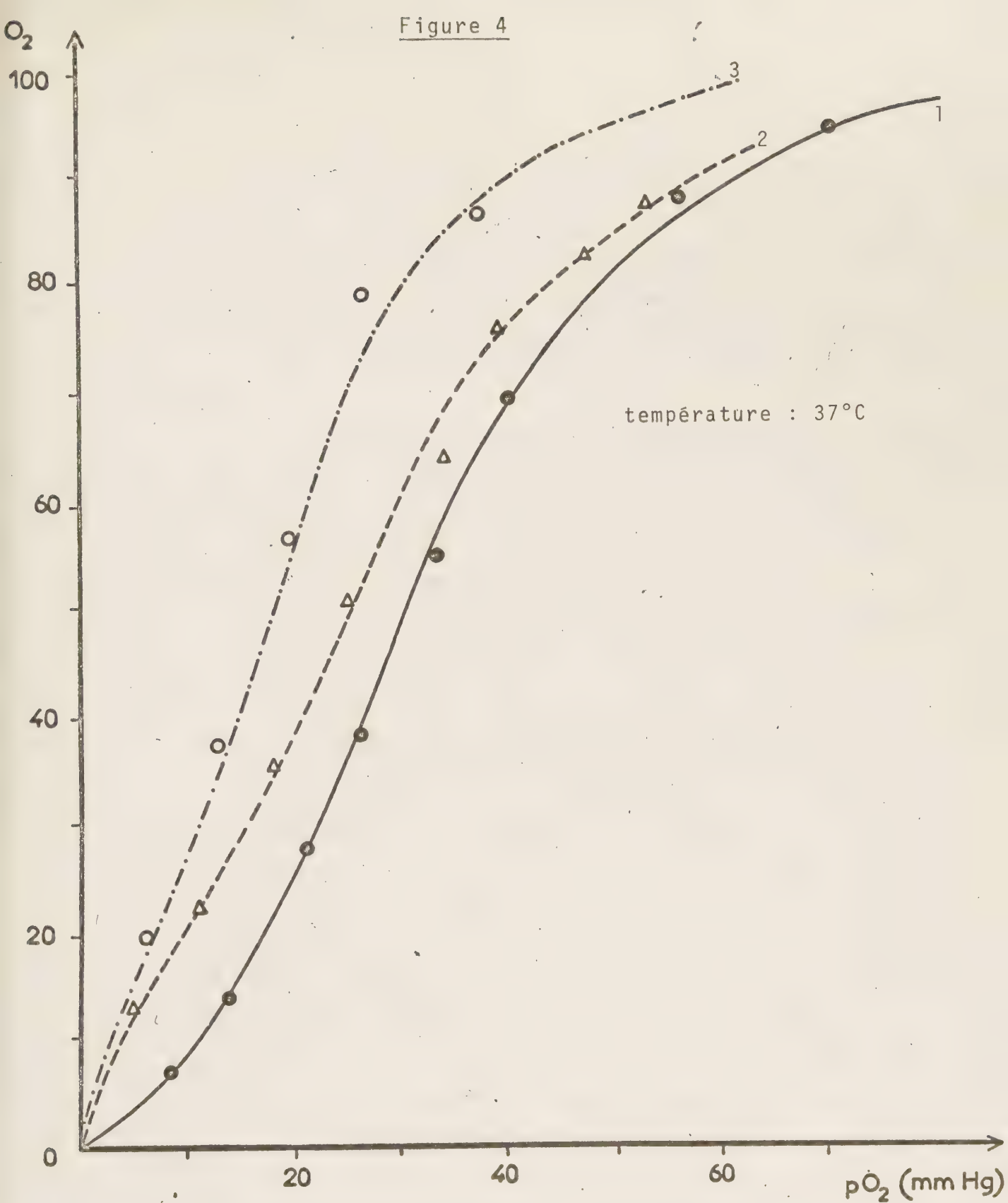
L'étude de la fixation d'oxygène a été pratiquée sur des globules rouges entiers lavés suspendus dans des tampons isotoniques du pH 7,1 et 7,4 (fig. 4) (page 47).

Elle a montré :

- une courbe d'aspect diphasique
- une affinité augmentée pour l'oxygène, comme en témoigne l'aspect non sigmoïde de la courbe pour les faibles valeurs de la pression partielle en oxygène.
- un $\bar{n}$ de Hill (qui est un témoin de cette sigmoïdité) abaissé à 1,9 (normal : 2,7).
- un effet Bohr diminué

L'ensemble de ces résultats rend compte de la présence d'une hémoglobine ayant perdu ses propriétés allostériques de coopérativité.

Figure 4



Courbe de fixation d'oxygène sur l'hémoglobine

- | | | | |
|-----|------------------------|-------------------|-----------|
| 1 - | suspension de cellules | entières normales | - pH 7,13 |
| 2 - | - | de Madame P..... | - pH 7,13 |
| 3 - | - | de Madame P..... | - pH 7,49 |

IV - Isolement de la protéine mutée

1) Les méthodes préparatives utilisant la différence de charge de l'hémoglobine anormale n'ont pu être utilisées du fait de leur mauvais rendement.

2) Le protocole expérimental suivi a alors été le suivant :

a) après chromatographie sur CM-Séphadex, concentration désionisation, on a vérifié par électrophorèse la persistance de la fraction anormale et la disparition des protéines non hémoglobiniques (bande plus cathodique),

b) puis la protéine mutée a été préparée par précipitation thermique et par le PMB.

V - Détermination du siège de la substitution

1) Le précipité par dénaturation thermique a été lavé, déshéminisé. Les chaînes sur acétate de cellulose ou sur CM-cellulose n'ont pu être séparées, la globine ne se dissociant pas. La globine a été amino-éthylée, et hydrolysée par la trypsine. Le "finger-print" s'est révélé comparable à celui d'une globine normale amino-éthylée.

2) Le précipité par le PMB était une chaîne β pure, et c'est à partir de lui que l'étude de structure a été menée.

Tableau I

	Composition comparée en acides aminés	
	Chaîne β normale	Précipité par le PMB de l'Hb P....
Lys	11	10,9
His	9	9,2
Arg	3	3,3
Asp	13	12,9
Thr	7	7,1
Ser	5	5,1
Glu	11	10,8
Pro	7	7,3
Gly	13	11,9
Ala	15	14,9
Cys	2	?
<u>Val</u>	18	13 (<u>16</u> après 72 heures)
<u>Met</u>	1	<u>1,05</u>
Ile	0	0,3
Leu	18	18,05
Tyr	3	3,1
Phe	8	7,25
Trp	2	?

a) Sa composition avait montré qu'il s'agissait d'une chaîne β . Mais on peut noter des anomalies : un chiffre anormalement bas de résidus de valine (13 après 22 heures d'hydrolyse, et 16 après 72 heures, pour 18 normalement), et un chiffre élevé de résidus de méthionine (1,05 pour 1 normalement), compte tenu que cet acide aminé est détruit d'au moins 50 p. 100 par l'hydrolyse (Tableau I) (page 49).

b) Les groupes thiols de la globine ont été régénérés par le β -mercapto-éthanol, puis alkylés par l'éthylène-imine. La globine a été hydrolysée par la trypsine.

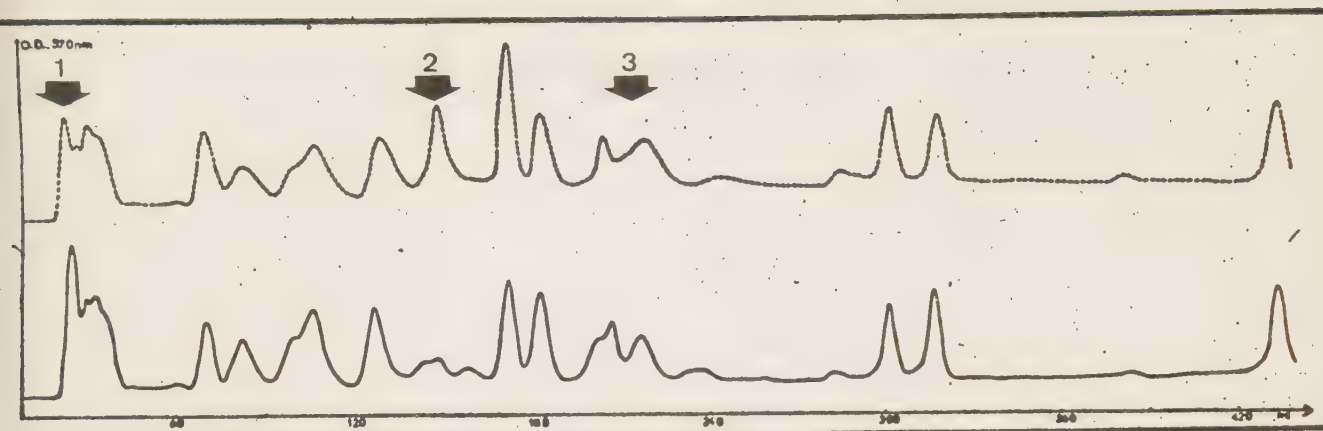
c) Le profil d'élution sur résine Beckman PA 35, comparé à celui d'une chaîne β normale amino-éthylée a montré trois anomalies (fig. 5)(page 51):

- un front d'élution de hauteur diminuée,
- un pic supplémentaire juste avant l'élution de l'ammoniaque,
- la zone d'élution du β T 11, β T 10, β T 8 d'aspect modifié.

d) Les purifications de ces zones suspectes ont montré :

- dans le front d'élution de la colonne qui normalement contient deux peptides très acides les β T 3 et β T 5, une très faible quantité de ce dernier,
- dans le pic supplémentaire, on a retrouvé outre un β T 8-9 normal, un β T 5 modifié (absence de méthionine).

Figure 5



Profils d'élution comparés de l'hydrolysate trypsique d'une chaîne β normale amino-éthylée (tracé plein) et de la chaîne β mutée précipitée par le PMB (tracé pointillé) sur colonne de résine Beckman PA 35.

Trois anomalies apparaissent sur le profil de la chaîne mutée

- un front d'élution de hauteur diminuée, (1)
- un pic supplémentaire, (2)
- la zone d'élution du $\beta T11$, $\beta T8$, $\beta T10$, d'aspect modifié. (3)

- la troisième zone suspecte contenait de la lysine libre (β T 8) ; un β T 10 normal ; un β T 14-15 normal, peptide double rarement retrouvé ; et un β T 11, qui à sa composition en acides aminés, a montré l'absence de valine, et la présence de méthionine (Tableau 2) (page 53).

Tableau II

	Composition comparée en acides aminés	
	βT11 normal	βT11 retrouvé
Lys		
His	1	0,95
Arg	1	0,9
Asp	2	2,0
Thr		
Ser		
Glu	1	1,2
Pro	1	1,0
Gly		
Ala		
Cys		
<u>Val</u>	1	<u>0,1</u>
<u>Met</u>		<u>0,54 + Méthionine sulfoxyde</u>
Ile		
Leu	1	1,1
Tyr		
Phe	1	0,95
Trp		

DISCUSSION

I - La séquence du β T 11 est :

Leu⁹⁶ - His - Val⁹⁸ - Asp - Pro - Glu - Asn - Phe - Arg¹⁰⁴

1) La substitution observée sur le β T 11 (remplacement d'une valine par une méthionine), ne peut porter que sur la valine β 98 (FG 5) (Tableau III) (page 55).

La valine est codée par les triplets GUA, GUU, GUC, ou GUG ; la méthionine par le triplet AUG ; la mutation observée est donc due à une modification de la première lettre du codon qui code pour la valine β 98 sur le gène (GUG $\longrightarrow$ AUG).

2) Cette mutation a déjà été décrite par CARRELL et LEHMANN (17) pour l'hémoglobine Köln.

3) La mutation observée entraîne le remplacement d'un résidu neutre par un autre résidu neutre : ceci ne devrait pas provoquer de modification de la charge de l'hémoglobine ; la différence de migration électrophorétique observée serait due à la modification de l'état d'ionisation d'un résidu d'histidine, peut-être le résidu 97 proche du résidu muté.

4) La modification observée sur le β T 5 est d'origine chimique : il s'agit, lors de l'amino-éthylation, de la

Séquences comparées des peptides β T11 de l'hémoglobine

normale et de l'hémoglobine Köln

96 97 98 99 100 101 102 103 104

Hémoglobine A Leu - His - Val - Asp - Pro - Glu - Asn - Phe - Arg

Hémoglobine Köln Leu - His - Met - Asp - Pro - Glu - Asn - Phe - Arg

fixation d'éthylène-imine sur une méthionine (β 55). Ceci transforme le résidu en un complexe éthylène-imine-méthionine très basique, ce qui explique l'élution à un pH plus élevé du peptide β T 5.

Un tel fait a été retrouvé par CLEGG pour la chaîne α de l'hémoglobine (19), et par SCHROEDER pour la catalase (74).

On a pu vérifier l'intégrité du β T 5 dans le précipité thermique.

Dans la chaîne β A il existe normalement un seul résidu de méthionine (β 55) ; dans la chaîne β Köln, il en existe un autre (β 98). Ce résidu n'a pas été modifié du fait de sa moins grande réactivité, en raison de son environnement par deux résidus polaires (histidine 97 et aspartique 99).

II - La connaissance de la structure tertiaire de la molécule d'hémoglobine, et par voie de conséquence du mécanisme intime de la physiologie de la protéine, permet de mieux comprendre les troubles observés pour l'hémoglobine Köln (48).

Le résidu Val β 98 (FG 5) est un résidu très important pour la structure de la protéine (58) :

- il est impliqué dans une liaison avec une chaîne vinylique de l'hème,

- et fait partie du contact $\alpha^1 \beta^2$, en relation avec la thréonine α 28 (C 3).

1) L'instabilité observée est en rapport avec le remplacement de la valine, petit acide aminé, par de la méthionine, acide aminé qui occupe dans l'espace un volume beaucoup plus grand.

2) La liaison avec l'hème est labilisée par la méthionine : de ce fait l'hémoglobine a tendance à se déshéminiser spontanément en précipitant ; ceci explique l'aspect blanchâtre du précipité, et un rapport des densités optiques à 415 et 280 m μ du précipité resolubilisé plus en faveur d'une globine que d'une hémoglobine.

3) La mutation portant sur un des résidus du contact $\alpha^1 \beta^2$, entrave les mouvements que l'on observe lors du phénomène d'oxygénation, et empêche les interactions allostériques entre chaînes α et β nécessaires au phénomène de coopérativité. Tout ceci se traduit par la courbe de fixation d'oxygène.

4) La formation de corps de Heinz est due à l'augmentation dans le globule rouge du taux de globine libre du fait de la déshéminisation spontanée de l'hémoglobine anormale. Celle-ci a tendance à se dénaturer, puis à adhérer à la membrane globulaire par formation d'un pont disulfure entre les groupes thiols de la globine et de la membrane.

Ceci altère la membrane, et est responsable de l'hémolyse, qui a lieu dans la rate (on comprend l'effet bénéfique de la splénectomie sur l'anémie).

5) La précipitation spécifique de la chaîne β pathologique par le PMB n'est pas due à la dissociation des chaînes, mais à la fixation du réactif sur les groupes thiols. L'hémoglobine Köln, placée dans des conditions de dissociation en monomères (pH 4,7) n'a pas précipité. Donc la réactivité des résidus de cystéine de la molécule a joué un rôle important dans le phénomène, probablement surtout celle de la cystéine β 93, proche dans l'espace du résidu muté et que JACOBS a trouvé anormale dans l'hémoglobine Köln (37).

CONCLUSIONS

1) Dans une première partie nous avons résumé l'état de nos connaissances sur les hémoglobines anormales. Une classification rationnelle en est donnée, tenant compte des propriétés physiologiques qui sont altérées. Ceci a été facilité par la connaissance des relations entre la structure et la fonction de l'hémoglobine, grâce aux récents travaux de PERUTZ sur la structure tridimensionnelle de la protéine.

2) Les hémoglobines instables (les hémoglobines à affinité anormale pour l'oxygène n'en sont qu'un cas particulier) forment une classe d'hémoglobinopathies médicalement très importante.

3) Devant un tableau d'anémie hémolytique chronique avec corps de Heinz, sans trouble d'un des enzymes de la glycolyse du globule rouge, parfois devant une polyglobulie, ou l'émission d'urines noires, il faut en envisager le diagnostic. Celui-ci sera confirmé par des examens complémentaires spécialisés :

- Une électrophorèse de l'hémoglobine : parfois elle montrera une fraction de migration anormale; mais aussi parfois elle ne montrera rien, la charge globale de l'hémoglobine anormale n'étant pas modifiée par une substitution se faisant entre deux acides aminés neutres.

- Surtout la mise en évidence de l'instabilité de l'hémoglobine elle-même par différents tests (chauffage modéré, réactifs des groupes thiols,)

- L'étude de la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine (technique qui ne peut être entreprise que par des laboratoires hautement spécialisés) pourra montrer la présence d'une hémoglobine non fonctionnelle, parfois responsable d'une polyglobulie par sécrétion d'érythropoïétine réactionnelle à l'anoxie qu'elle entraîne.

4) Ces hémoglobines anormales à affinité modifiée pour l'oxygène offrent un champ d'investigation très vaste, car elles permettent une meilleure compréhension de la pathologie moléculaire et partant de la biologie moléculaire de l'hémoglobine.

5) Dans une seconde partie nous avons décrit un travail personnel, qui a consisté en l'étude fonctionnelle et structurale d'une hémoglobine anormale particulièrement intéressante :

- Cliniquement, elle se traduit par une anémie hémolytique chronique modérée, avec corps de Heinz.

- Ce tableau est en rapport avec la présence d'une hémoglobine anormale instable, dont l'affinité pour l'oxygène est augmentée.

- La recherche du siège et du type de la substitution responsable a montré qu'il s'agissait d'une substitution déjà décrite : l'hémoglobine Köln. Il s'agit là du premier cas français décrit de cette hémoglobinopathie, les autres sujets la présentant étant d'origine allemande.

- Cependant, notre technique d'étude a été entièrement originale : dans des conditions séparant normalement les chaînes de l'hémoglobine et bloquant les groupes thiols de la protéine, nous avons pu isoler directement la chaîne anormale par précipitation spécifique.

Vu :
Le Président
de la thèse,

G. SCHAPIRA.

Vu :
Le Doyen Honoraire
Administrateur Provisoire
de la Faculté de Médecine,

G. BROUET

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,

M. MALLET.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANSON (M.L.), MIRSKY (A.E.)
Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme.
J. Gen. Physiol., (1930), 13, 469
2. BAGLIONI (C.)
The fusion of two peptides chains in Hb Lepore and its interpretation as a genetic deletion.
Proc. Nat. Acad. Sci., (1962), 48, 1880
3. BAGLIONI (C.)
Abnormal human haemoglobins. X - A study of haemoglobin Lepore Boston.
Biochem. Biophys. Acta (1965), 97, 37
4. BELLINGHAM (A.J.), HUEHNS (E.R.)
Compensation in haemolytic anaemias caused by abnormal haemoglobins.
Nature (1968), 218, 5145
5. BENESCH (R.), BENESCH (R.E.)
Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin.
Nature (1969), 221, 618
6. BENESCH (R.), MACDUFF (G.), BENESCH (R.E.)
Determination of oxygen equilibria with a versatile new tonometer.
Arch. Biochem., (1965), 11, 81
7. BEUZARD (Y.)
Isolement et purification des peptides tryptiques de la chaîne β de l'hémoglobine A en ultra-micro-méthode automatique.
D.E.A. de Biochimie (1968), Paris
8. BONAVENTURA (J.), RIGGS (A.)
Hemoglobin Kansas, a human hemoglobin with a neutral amino acid substitution and an abnormal oxygen equilibrium.
J. Biol. Chem., (1968), 243, 980
9. BOOKCHIN (R.M.), GALLOP (P.M.)
Structure of hemoglobin A_{1c} : nature of the N-terminal β chain blocking group.
Biochim. Biophys. Res. Comm., (1968), 32, 86

10. BOTHA (M.C.), BEALE (D.), ISAACS (W.A.), LEHMANN (C.H.)
Haemoglobin J. Cape Town α_2 92 Arginine $\rightarrow$ Glutamine β_2
Nature (1966), 212, 792
11. BRADLEY (T.B.), WOHL (R.C.), RIEDER (R.F.)
Haemoglobin Gun Hill : Deletion of five amino acid residues and impaired heme-globin binding
Science (1967), 157, 3796
12. BRAUNITZER (G.), RUDLOFF (V.), HILSCHMANN (N.)
Haemoglobin: X - Die analyse der α and β Ketten des adulten normalen humanhaemoglobins aus seinen tryptischen Splatprodukten-2
Physiol. Chem., (1963), 331, 1
13. BRIMHALL (B.), JONES (R.T.), BAUR (E.N.), MOTULSKY (A.G.)
Structural characterization of hemoglobin Tacoma
Biochemistry (1969), 8, 2125
14. BUCCI (E.), FRONTICELLI (C.)
A new method for the preparation of α and β subunits of human hemoglobin
J. Biol. Chem., (1965), 240, 551
15. BUCCI (E.), FRONTICELLI (C.), CHIANCONE (E.), WYMAN (J.), ANTONINI (E.), ROSSI-FANELLI (A.)
The properties and interactions of the isolated α and β chains of human haemoglobin. I - Sedimentation and electrophoretic behavior.
J. Mol. Biol., (1965), 12, 133
16. CARRELL (R.W.), LEHMANN (H.)
The unstable haemoglobin haemolytic anaemias
Seminars in Haematology (1969), 6, 116
17. CARRELL (R.W.), LEHMANN (H.), HUTCHISON (R.F.)
Haemoglobin Köln (β 98 Val $\rightarrow$ Met) an unstable protein causing inclusion body anaemia
Nature (1966), 210, 915
18. CLEGG (J.B.), NAUGHTON (M.A.), WEATHERALL (D.J.)
Abnormal human hemoglobins. Separation and characterization of the α and β chain by chromatography and determination of two new variants, hemoglobin Chesapeake, and hemoglobin J Bangkok.
J. Mol. Biol., (1966), 19, 91

19. CLEGG (J.B.), WEATHERALL (D.J.), SUPA NA-NAKORN;
PRAWASE WASI
Haemoglobin synthesis in β -thalassaemia.
Nature (1968), 220, 664
20. CORTESI (S.), VETTORE (L.), FREZZA (M.), PERONA (G.)
Identificazione di catene emoglobiniche anomale mediante
electroforesi su acetate di cellulosa gelatinizzate.
Acta Medica Patavina (1966), 26, 573
21. CULLIS (A.F.), MUIRHEAD (H.), PERUTZ (M.F.), ROSSMANN (G.):
NORTH (A.C.T.)
The structure of hemoglobin. IX - A three dimensional
Fourier synthesis at 5,5 Å resolution : Description of
the structure.
Proc. Roy. Soc., (1962), 265, 161
22. DACIE (J.V.), GRIMES (A.J.), MEISLER (A.), STEINGOLD (L.),
HEMSTED (E.H.), BEAVEN (G.H.), WHITE (J.C.)
Hereditary Heinz-body anaemia, a report of studies on five
patients with mild anaemia.
Brit. J. Haemat., (1964), 10, 388
23. DACIE (J.V.), SHINTON (N.K.), GRAFFNEY (J.P.J.),
CARRELL (R.W.), LEHMANN (H.)
Haemoglobin Hammersmith (β^{42} (CD1) Phe $\rightarrow$ Ser)
Nature (1967), 216, 663
24. DELIVORIA-PAPADOPOULOS (M.), OSKI (F.A.), GOTTLIEB (A.J.)
Oxygen-hemoglobin dissociation curves : effect of inhe-
rited enzyme defects on the red cell.
Science (1969), 165, 601
25. DOZY (A.M.), KLEIHauer (E.F.), HUISMAN (T.M.J.)
Studies on the heterogeneity of hemoglobin. XIII - Chro-
matography of various human and animal hemoglobins types
on DEAE Sephadex.
J. Chromatog., (1968), 32, 723
26. DRABKIN (D.L.)
A simplified technic for a large scale crystallisation
of human hemoglobin. Isomorphous transformation of he-
moglobin and myoglobin in the crystalline state.
Arch. Biochem., (1949), 21, 224.
27. FESSAS (P.)
The heterogeneity of thalassemia
XII Congress International Society of Haematology (1968)
52.

28. GERALD (P.S.), EFRON (M.L.)
Chemical studies of several variety of hemoglobin M.
Proc. Nat. Acad. Sci., (1961), 47, 1758
29. HAMILTON (H.B.), TUCHI (T.), MIYAJI (T.), SHIBATA (S.)
Hemoglobin Hiroshima (β 143 Histidine $\longrightarrow$ Aspartic acid):
a newly identified fast moving beta chain variant associated with increased oxygen affinity and compensatory erythremia.
J. Clin. Invest., (1969), 48, 525
30. HELLER (P.), COLEMAN (R.D.), YAKULIS (V.)
Hemoglobin M Hyde Park : A new variant of abnormal methemoglobin.
J. Clin. Invest., (1966), 45, 1021 (abstr.)
31. HILL (R.J.), KONIGSBERG (W.)
The structure of human hemoglobin. IV - The chymotryptic digestion of the δ chain of human hemoglobin.
J. Biol. Chem., (1962), 237, 3151
32. HUEHNS (E.R.), BELLINGHAM (A.J.)
Diseases of function and stability of haemoglobin.
Brit. J. Haemat., (1969), 17, 1
33. HUEHNS (E.R.), HECHT (F.), KEIL (J.V.), MOTULSKY (A.G.)
Developmental hemoglobin anomalies in a chromosomal triplication : D1 trisomy syndrome.
Proc. Nat. Acad. Sci., (1964), 51, 89
34. HUEHNS (E.R.), SHOOTER (E.M.)
Human haemoglobins.
J. Med. Genet., (1965), 2, 48
35. INGRAM (V.M.)
Abnormal human haemoglobins. I - The comparison of normal human and sickle haemoglobin by "finger-printing".
Biochim. Biophys. Acta (1958), 28, 539
36. INGRAM (V.M.)
The hemoglobins in genetics and evolution
Columbia Univ. Press, N.Y., (1963)
37. JACOBS (H.S.), BRAIN (M.C.), DACIE (J.V.), CARRELL (R.W.)
LEHMANN (H.)
Abnormal haem binding and globin SH group blockade in unstable haemoglobin.
Nature (1968), 218, 1214

38. JONES (R.T.)
Structural studies of amino-ethylated hemoglobins by
automatic peptide chromatography
Cold Spring Harbor Symp., (1964), 29, 297
39. JONES (R.T.)
Automatic peptide chromatography.
Methods of Biochem. Analysis (1969), 8
40. JONES (R.T.), BRIMHALL (B.), HUISMAN (T.H.J.)
KLEIHAVER (E.), BETKE (K.)
Hemoglobin Freiburg : Abnormal hemoglobin due to dele-
tion of a single amino-acid residue.
Science (1966), 154, 1024
41. JONES (R.T.), OSGOOD (E.E.), BRIMHALL (B.), KOLER (R.D.)
Hemoglobin Yakima : I - Clinical and biochemical studies
J. Clin. Invest., (1967), 46, 1840
42. JONG (W.W.W. de), WENT (L.N.), BERNINI (L.F.)
Haemoglobin Leiden : Deletion of $\beta 6$ or 7 glutamic acid.
Nature (1968), 220, 788
43. KLEIHAUER (E.F.), REYNOLDS (C.A.), DOZY (A.M.), WILSON (J.I.)
MOORES (R.R.), BERENSON (M.P.), WRIGHT (C.S.), HUISMAN
(T.H.J.).
Hemoglobin Bibba or α_2 136 Pro β_2 , an unstable α chain
abnormal hemoglobin.
Biochim. Biophys. Acta (1968), 154, 220
44. KOYAMA (S.), AOKI (S.), DEGUCHI (K.)
Electron microscopic observations of the splenic red
pulp with special reference to the pitting function
Mie. Med. J., (1964), 14, 143
45. KUNKEL (H.G.)
Zone electrophoresis.
In : "Methods of Biochemical Analysis", ed. N.Y. Inter-
sciences, (1953), I, I, 141
46. LABIE (D.), ROSA (J.), DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.)
Interspecific hybridization of haemoglobin.
Nature (1962), 194, 384
47. LABIE (D.), SCHROEDER (W.A.), HUISMAN (T.H.J.)
The amino-acid sequence of δ - β chains of hemoglobin
Lepore Augusta = Lepore Washington.
Biochim. Biophys. Acta (1966), 127, 428

48. LEHMANN (H.), CARRELL (R.W.)
Variations in the structure of human haemoglobin. With particular reference to the unstable haemoglobins.
Br. Med. Bull., (1969), 25, 14
49. MIYAJI (J.), SHIRATA (S.), TAKEDA (I.), TAMURA (A.)
Possible amino acid substitution in the α chain (87 Tyr) of Hb M Iwate
Acta Haemat. Jap., (1963), 26, 538
50. MONOD (J.), CHANGEUX (J.P.), JACOB (F.)
Allosteric proteins and cellular control system
J. Mol. Biol., (1963), 6, 306
51. MONOD (J.), WYMAN (J.), CHANGEUX (J.P.)
On the nature of allosteric transitions : a plausible model.
J. Mol. Biol., (1965), 12, 88
52. MUIRHEAD (H.), PERUTZ (M.F.)
Structure of Haemoglobin
Nature, (1963), 199, 633
53. MURAYAMA (M.)
Molecular mechanism of red cell "sickling"
Science, (1966), 153, 145
54. NAGEL (R.L.), GIBSON (Q.H.), CHARACHE (S.)
Relation between structure and function in haemoglobin Chesapeake
Biochemistry, (1967), 6, 2395
55. PAULING (L.), ITANO (H.A.), SINGER (S.J.), WELLS (I.C.)
Sickle cell anemia : a molecular disease.
Science, (1949), 110, 543
56. PERUTZ (M.F.)
Suggested interpretation of diminished Bohr effect in haemoglobin Hiroshima
Nature, (1959), 224, 269
57. PERUTZ (M.F.), LEHMANN (H.)
Molecular pathology of human haemoglobin
Nature, (1968), 219, 902
58. PERUTZ (M.F.), MUIRHEAD (H.), COX (J.M.), GOAMAN (L.C.G.)
Three -dimensional Fourier synthesis of Horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution : the atomic model.
Nature, (1968), 219, 131

59. PERUTZ (M.F.), MUIRHEAD (H.), MAZZARELLA (L.)
CROWTHER (R.R.), GREER (J.), KILMARTIN (J.V.)
Identification of residues responsible for the alkaline
Bohr effect in haemoglobin
Nature (1969), 222, 1240
60. PIETSCHMANN (H.), LORKIN (P.A.), LEHMANN (H.),
BRAUNSTEINER (H.)
Haemoglobin Wien. A paraître. (En référence dans 48).
61. PIEZ (K.), MORRIS (L.)
A modified procedure for the automatic analysis of amino-
acids.
Anal. Biochem., (1960), 1, 3
62. RAFTERY (M.A.), COLE (R.D.)
Tryptic cleavage at cysteinyl peptide bonds
Biochem. Biophys. Res. Comm., (1963), 10, 467
63. REED (C.S.), HAMPSON (R.), GORDON (S.), JONES (R.T.),
NOVY (M.J.), BRIMHALL (B.), EDWARDS (M.J.), KOLER (R.D.)
Erythrocytosis secondary to increased oxygen affinity
of a mutant hemoglobin, hemoglobin Kempsey
Blood (1968), 31, 623
64. RIEDER (R.F.), BRADLEY (T.B.)
Hemoglobin Gun Hill : an unstable protein associated with
chronic hemolysis.
Blood (1968), 32, 355
65. RIEDER (R.F.), OSKI (F.A.), CLEGG (J.B.)
Hemoglobin Philly (β 35 Tyrosine $\rightarrow$ Phenylalanine) :
Studies in the molecular pathology of hemoglobin
J. of Clin. Invest., (1969), 48, 1627
66. ROBIN (P.), ROBIN (D.), JACQUOT (R.)
Submicrodetermination des acides aminés
Bull. Soc. Chim. Biol., (1967), 49, 449
67. ROSA (J.), LABIE (D.)
Change in A_3 haemoglobin due to β chain
Nature, (1962), 196, 901
68. ROSA (J.), LABIE (D.), WAJCMAN (H.), BOIGNE (J.M.);
CABANNES (R.), BIERME (R.), RUFFIE (J.)
Haemoglobin I Toulouse : β 66 (E10) Lys $\rightarrow$ Glu : a new
abnormal haemoglobin with a mutation localized on the
E10 Porphyrin surrounding zone.
Nature (1969), 223, 190

69. ROSEMEYER (M.A.), HUEHNS (E.R.)
On the mechanism of the dissociation of haemoglobin
J. Mol. Biol., (1967), 25, 253
70. SCHNEIDER (R.G.), SATOSHI UEDA, ALPERIN (J.B.)
BRIMHALL (B.), JONES (R.T.)
Hemoglobin Sabine - β 91 (F7 Leu $\longrightarrow$ Pro - An unstable
variant causing severe anemia with inclusion Bodies
New Engl. J. Med., (1969), 280, 739
71. SCHROEDER (W.A.)
The hemoglobins
Ann. Rev. Biochem., (1963), 32, 301
72. SCHROEDER (W.A.)
Separation of peptides by chromatography on columns of
Dowex 1 with volatile developers
In Meth. in Enz. (1967), 11, 361
73. SCHROEDER (W.A.), JONES (R.T.), SHELTON (J.R.),
SHELTON (J.B.), CORMICK (J.), Mc CALLA (K.)
A partial sequence of the amino-acids residues in the γ
chain of human hemoglobin F
Proc. Nat. Acad. Sci., (1961), 47, 811
74. SCHROEDER (W.A.), SHELTON (J.R.), ROBERSON (B.)
Modification of methionyl residues during amino-ethylation
Biophys. Biochem. Acta, (1967), 147, 590
75. SERINGE (Ph.), ROSA (J.), COMBRISSE (A.), HALLEZ (J.)
GOROUBEN (J.C.), DESPRES (P.)
Maladie hémolytique congénitale avec hémoglobine anor-
male, inclusions intraérythrocytaires, et urines noires.
Presse Méd., (1965), 73, 3051
76. SMITHIES (O.)
Zone electrophoresis in starch gels : group variations
in the serum proteins of normal adults
Biochem. J., (1955), 61, 629
77. SPACKMAN (D.M.), STEIN (W.H.), MOORE (S.)
Automatic recording apparatus for use in the chromato-
graphy of amino-acids.
Anal. Chem., (1958), 30, 1190
78. STAMOYANNOPOULOS (G.), YOSHIDA (A.), ADAMSON (J.),
HEINENBERG (S.)
Hemoglobin Rainier (β 145 Tyrosine $\longrightarrow$ Histidine) :
Alkali-resistant hemoglobin with increased oxygen
affinity
Science, (1968), 159, 741

79. WEATHERALL (D.J.)
The genetics of the thalassemias
British Medical Bull., (1969), 25, 24
80. WINTHERHALTER (N.H.), HUEHNS (E.R.)
Preparation, properties and specific recombination of
 α β globin subunits.
J. Biol. Chem., (1964), 239, 3699
81. ZIJLSTRA (W.G.), VON KAMPEN (E.J.)
Standardization of the hemoglobinometry : the hemoglobin
cyanid method.
Clin. Chem. Acta, (1961), 6, 538
82. ZUCKERKANDL (E.)
The evolution of hemoglobin
Scientific Amer., (1965), 212, 110

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
LES HEMOGLOBINES HUMAINES NORMALES ET ANORMALES	3
1) Structure des hémoglobines normales	4
- Chez l'adulte	4
- Au cours de la vie in utéro	5
- Structure primaire	5
- Structure tridimensionnelle	5
2) Les hémoglobines anormales	10
- Les mutations de la surface de la molécule	12
- Les mutations de la poche de l'hème	13
- Les hémoglobines instables	14
- Les autres types de mutations	17
3) Fonction de l'hémoglobine. Les hémoglobines à affinité modifiée pour l'oxygène	19
TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DE L'HEMOGLOBINE KÖLN	25
DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE KÖLN	42
1) Observation clinique	42
2) Résultats des techniques entreprises pour l'étude fonctionnelle et structurale de l'hémoglobine Köln	44
3) Discussion	54
CONCLUSIONS	59
BIBLIOGRAPHIE	63

